

PCT/EP200 4 / 0 0 6 6 0 8

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 28 JUL 2004

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 28 067.7

Anmeldetag:

23. Juni 2003

Anmelder/Inhaber:

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,
51368 Leverkusen/DE

Bezeichnung:

Isoliertes Photoprotein Bolinopsin, sowie
dessen Verwendung

IPC:

C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

BEST AVAILABLE COPY

Isoliertes Photoprotein Bolinopsin, sowie dessen Verwendung

5 Die Erfindung betrifft das Photoprotein Bolinopsin, dessen Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des Photoproteins Bolinopsin.

Photoproteine

10 Als Biolumineszenz bezeichnet man das Phänomen der Lichterzeugung durch Lebewesen. Sie ist das Ergebnis von biochemischen Reaktionen in Zellen, bei denen die chemische Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird (sog. kalte Emission durch Chemolumineszenz). Derartig erzeugtes Licht ist monochromatisch, denn es wird bei einem diskreten Elektronen-Übergang abgestrahlt, kann aber durch sekundäre Leuchtfarbstoffe (z.B. fluoreszierende Proteine bei Leuchtquallen der Gattung Aequora) in längerwellige Spektralbereiche verschoben werden.

15 Die biologische Funktion ist vielfältig: In der Meerestiefe zwischen 200 und 1000 m (Mesopelagial) leuchten rund 90% aller Lebewesen. Die Leuchtsignale werden hier zur Partnerwerbung, Täuschung und als Köder eingesetzt. Auch Glühwürmchen und Leuchtkäfer nutzen die Lichtsignale zur Partnersuche. Die Bedeutung des Leuchtens von Bakterien, Pilzen und einzelligen Algen ist dagegen unklar. Es wird vermutet, dass es zur Koordination von vielen Einzel-Individuen einer großen Population eingesetzt wird oder eine Art biologische Uhr darstellt.

20 Eine Vielzahl an Coelenteraten ist biolumineszent (Morin et al., 1974). Diese Organismen emittieren blaues oder grünes Licht. Das 1962 als erstes Licht produzierendes Protein identifizierte Aequorin aus Aequoria victoria (Shimomura et al., 1969) emittierte als isoliertes Protein ein blaues Licht und nicht grünes Licht wie phänotypisch beobachtet bei Aequoria victoria. Später konnte das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus Aequoria victoria isoliert werden, das aufgrund
25 30 der Anregung durch das Aequorin die Meduse phänotypisch grün erscheinen lässt

(Johnson et al, 1962; Hastings et al., 1969; Inouye et al, 1994). Als weitere Photoproteine konnten noch Clytin (Inouye et al., 1993), Mitrocomin (Fagan et al., 1993) und Obelin (Illarionov et al., 1995) identifiziert und beschrieben werden.

- 5 **Tabelle 1:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben ist der Name, der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist und die Identifikationsnummer (Acc. No.) des Datenbankeintrages.

Name	Organismus	Identifikations Nr.
Obelin	Obelia geniculata	AAL86372
Clytin	Clytia gregaria	CAA49754
Aequorin	Aequorea macrodactyla	AAK02061
Aequorin	Aequorea parva	AAK02060
Mitrocomin	Mitrocoma cellularia	AAA29298
Pholasin	Pholas dactylus	AAM18085
?	Symplectoteuthis oualaniensis	AX305029

- 10 **Tabelle 2:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben ist der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, der Name des Photoproteins und eine Auswahl an Patenten bzw. Anmeldungen.

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Obelia geniculata	Obelin	WO03006497
Aequoria victoria	Aequorin	WO200168824 US-0908909 US 6,152,358 JP-0176125
Pholas dactylus	Pholasin	WO0028025 GB-0024357

Biolumineszenz wird heute in der Technik vielfältig genutzt, z.B. in Form von Bio-Indikatoren für Umweltverschmutzung oder in der Biochemie zum empfindlichen Nachweis von Proteinen, zur Quantifizierung bestimmter Verbindungen oder als sogenannte "Reporter" bei der Untersuchung zellulärer Gen-Regulation.

Die Photoproteine unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sondern auch aufgrund ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Aminosäuresequenz von Photoproteinen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften verändert werden können. Beispiele von mutagenisierten Photoproteinen sind in der Literatur beschrieben (US 6,495,355; US 5,541,309; US 5,093,240; Shimomura et al., 1986).

Die Lichterzeugung durch die oben genannten Photoproteine erfolgt durch die Oxidation von Coelenterazin (Haddock et al., 2001; Jones et al., 1999).

Reportersysteme

Als Reporter- oder Indikatorgen bezeichnet man generell Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer oder histochemischer Methoden leicht nachweisen lassen. Man unterscheidet mindestens 2 Typen von Reportergenen.

1. Resistenzgene. Als Resistenzgene werden Gene bezeichnet, deren Expression einer Zelle die Resistenz gegen Antibiotika oder andere Substanzen verleiht, deren Anwesenheit im Wachstumsmedium zum Zelltod führt, wenn das Resistenzgen fehlt.
2. Reportergene. Die Produkte von Reportergenen werden in der Gentechnologie als fusionierte oder unfusionierte Indikatoren verwendet. Zu den gebräuchlichsten Reportergenen gehört die beta-Galaktosidase (Alam et

al., 1990), alkalische Phosphatase (Yang et al., 1997; Cullen et al., 1992), Luciferasen und andere Photoproteine (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne et al., 1984).

5 Als Lumineszenz bezeichnet man die Abstrahlung von Photonen im sichtbaren Spektralbereich, wobei diese durch angeregte Emitttermoleküle erfolgt. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird hierbei die Energie nicht von Außen in Form von Strahlung kürzerer Wellenlänge zugeführt.

10 Man unterscheidet Chemilumineszenz und Biolumineszenz. Als Chemolumineszenz bezeichnet man eine chemische Reaktion die zu einem angeregten Molekül führt, das selbst leuchtet, wenn die angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren. Wird diese Reaktion durch ein Enzym katalysiert, spricht man von Biolumineszenz. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme werden generell als Luziferasen bezeichnet.

15

Einordnung der Spezies *Bolinopsis infundibulum*

Eumetazoa → Radiata → Ctenophora → Tentaculata → Lobata → Bolinopsidae → *Bolinopsis infundibulum*

20

Isolierung der cDNA

25 Zur Untersuchung der Biolumineszenz-Aktivität der Spezies *Bolinopsis infundibulum* wurden Exemplare im Weißen Meer (Biologische Station Kartesh, Russland) gefangen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Erstellung der cDNA-Bibliotheken von *Bolinopsis infundibulum*, wurde die poly(a)+ RNA mit Hilfe des „Straight A“ Isolationsmethode von Novagen (USA) isoliert.

30

Zur Herstellung der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg RNA mit Reverser Transkriptase (Superscript Gold II) nach folgendem Schema inkubiert:

PCR	1.	30	Sekunden	95°C
	2.	6	Minuten	68°C
	3.	10	Sekunden	95°C
	4.	6	Minuten	68°C

17 Zyklen von Schritt 4 nach Schritt 3

Die Reaktionsprodukte wurden zur Inaktivierung der Polymerase für 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die Expression-cDNA Bank wurde mit Hilfe des „SMART cDNA Library Construction Kits“ der Firma Clontech (USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in den Expressionsvektor pTriplEx2 (Clontech; USA). Die Expressionsvektoren wurden durch Elektroporation in Bakterien des Stammes E. coli XL1-Blue transformiert.

Die Bakterien wurden auf LB-Nährböden plattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Replikaplattierung durchgeführt, indem die Bakterien mit Hilfe eines Nitrocellulosefilters auf eine weitere Nährbodenplatte übertragen wurde. Die Replikaplatte wurde wiederum für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Bakterienkolonien in LB-Flüssigmedium übertragen. Nach der Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) wurden die Bakterien für 4 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und die Bakterienmasse in 0,5 ml Aufschlusspuffer (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCL pH 9,0) bei 0°C resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterien durch Ultraschall.

Die Lysate wurden nach der Zugabe von Coelenterazine (Endkonzentration $10E-07$ M) bei 4°C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz nach der Zugabe von Calciumchlorid (Endkonzentration 20 mM) im Luminometer.

Es wurde ein Photoprotein identifiziert. Das Photoprotein wurde als Bolinopsin bezeichnet. Im Folgenden wird das Photoprotein Bolinopsin im einzelnen dargestellt.

5 **Bolinopsin**

Das Photoprotein Bolinopsin zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu Aequorin aus Aequoria victoria mit einer Identität von 44 % (gezeigt in Beispiel 8; Fig. 7). Auf Nukleinsäureebene liegt die Identität unter 30 % (gezeigt in Beispiel 9; Fig. 6). Zum Sequenzvergleich wurde das BLAST-Verfahren verwendet (Altschul et al., 1997).

10
15 Die Erfindung betrifft auch funktionelle Äquivalente von Bolinopsin. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind zu SEQ ID NO: 2. Bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 95 %.

20 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

25 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergen in bakteriellen und eukaryotischen Systemen speziell in Säugerzellen, in Bakterien, in Hefen, in Bakulo, in Pflanzen.

30 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergene für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine, für Glykoproteine.

5

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Immobilisierung speziell durch Antikörper, durch Biotin, durch magnetische oder magnetisierbare Träger.

10

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Protein für Systeme des Energietransfers speziell der FRET- (Fluorescence Resonance Energy Transfer), BRET- (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FET (field effect transistors), FP (fluorescence polarization), HTRF (Homogeneous time-resolved fluorescence) Systemen.

15

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Markierung von Substraten oder Liganden speziell für Proteasen, für Kinasen, für Transferasen.

20

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Expression in bakteriellen Systemen speziell zur Titerbestimmung, als Substrat für biochemische Systeme speziell für Proteinasen und Kinasen.

25

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

30

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Komponente von Detektionssystemen speziell für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), für Immunohistochemie, für Western-Blot, für die konfokale Mikroskopie.

5 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker für die Analyse von Wechselwirkungen speziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-Protein-Wechselwirkungen (DNA : deoxyribonucleic acid; RNA : ribonucleic acid;).

10 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein zur Analyse der Embryonalentwicklung.

15 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker über einen Kopplungsvermittler speziell über Biotin, über NHS (N-hydroxysulfosuccimide), über CN-Br.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reporter gekoppelt an Nukleinsäuren speziell an DNA, an RNA.

20 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

25 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reporter zur Messung von intra- oder extrazellulären Calciumkonzentrationen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Charakterisierung von Signalkaskaden in zellulären Systemen.

Das an Nukleinsäuren oder Peptiden gekoppelte Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Sonde speziell für Northern-Blots, für Southern-Blots, für Western-Blots, für ELISA, für Nukleinsäuresequenzierungen, für Proteinanalysen, Chip-Analysen.

5 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich Markierung von pharmakologischen Formulierungen speziell von infektiösen Agentien, von Antikörpern, von „small molecules“.

10 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich für geologische Untersuchungen speziell für Meeres-, Grundwasser- und Flusströmungen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefe Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

15

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Visualisierung von Geweben oder Zellen bei chirurgischen Eingriffen speziell bei invasiven, bei nicht-invasiven, bei minimal-invasiven.

20

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich auch zur Markierung von Tumorgeweben und anderen phänotypisch veränderten Geweben speziell bei der histologischen Untersuchung, bei operativen Eingriffen.

25

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des Photoprotein Bolinopsin speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

30

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin auf dem Gebiet der Kosmetik speziell von Badezusätzen, von Lotionen, von Seifen, von Körperfarben, von Zahncreme, von Körperpudern.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Färbung speziell von Nahrungsmitteln, von Badezusätzen, von Tinte, von Textilien, von Kunststoffen.

5 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Färbung von Papier speziell von Grußkarten, von Papierprodukten, von Tapeten, von Bastelartikeln.

10 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Färbung von Flüssigkeiten speziell für Wasserpistolen, für Springbrunnen, für Getränke, für Eis.

15 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Herstellung von Spielwaren speziell von Fingerfarbe, von Schminke.

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren.

20 Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 2 offenbart ist.

Die Erfindung bezieht sich des weiteren auf Nukleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 25 a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 umfasst;
- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;

- 5 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen;
- d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- 10 e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.

15

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Sequenzhomologie von mindestens 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % oder 60 % zu SEQ ID NO:1 aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, welches die Eigenschaften eines Photoproteins besitzt.

20

Die Erfindung betrifft die oben genannten Nukleinsäuremoleküle, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zu der das Photoprotein kodierenden Sequenz enthält.

25

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle wie vorhergehend beschrieben, die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

Die Erfindung betrifft Organismen, die einen solchen Vektor enthalten.

30

Die Erfindung bezieht sich auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zur DNA oder RNA

Sequenz der Bolinopsin Moleküle oder der weiteren erfindungsgemäßen Molekülen sind.

5 Die Erfindung betrifft Photoproteine, die durch die vorhergehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert sind.

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Expression der erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptide in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

10 Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptides.

15 Die Erfindung bezieht sich auf Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Photoproteine erkannt werden.

20 Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, für Photoproteine kodierende Nukleinsäuren als Marker- oder Reportergene, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

25 Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Photoproteine bzw. eine erfindungsgemäße, für ein Photoprotein kodierende Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker- oder Reportergen.

30 Die Erfindung betrifft die Verwendung des Photoproteins Bolinopsin (SEQ ID NO: 2) bzw. die Verwendung einer für das Photoprotein Bolinopsin kodierenden Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker oder Reportergen insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure als Marker- oder Reporteragen, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

5 Gegenstand der Erfindung sind auch polyklonale oder monoklonale Antikörper, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid erkennen.

Die Erfindung betrifft auch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die das Photoprotein Bolinopsin (SEQ ID NO: 2) erkennen.

10 **Expression der erfindungsgemäßen Photoproteine**

Als Expression bezeichnet man die Produktion eines Moleküls, das nach dem Einbringen des Gens in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in einen Expressionsvektor klonierte Fremdgen erlaubt. Expressionsvektoren enthalten die für die Expression von Genen in Zellen von Prokaryoten oder Eukaryoten erforderlichen Kontrollsignale.

15 Expressionsvektoren können prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen konstruiert werden. Bei den sogenannten Transcriptionsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als authentisches, biologisch aktives Protein synthetisiert. Der Expressionsvektor trägt hierzu alle zur Expression benötigten 5'- und 3'-Kontrollsignale.

20 Bei den sogenannten Translationsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als Hybridprotein zusammen mit einem anderen Protein exprimiert, das sich leicht nachweisen lässt. Die zur Expression benötigten 5'- und 3'-Kontrollsignale inklusive des Startcodons und eventuell ein Teil der für die N-terminalen Bereiche des zu bildenden Hybridproteins codierenden Sequenzen stammen vom Vektor. Der zusätzliche eingeführte Proteinteil stabilisiert nicht nur in vielen Fällen das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein vor dem Abbau durch

25

30

zelluläre Proteasen, sondern lässt sich auch zum Nachweis und zur Isolierung des gebildeten Hybridproteins einsetzen. Die Expression kann sowohl transient, als auch stabil erfolgen. Als Wirtsorganismen eignen sich sowohl Bakterien, Hefen, Viren als auch eukaryotische Systeme.

Reinigung der erfindungsgemäßen Photoproteine

Die Isolierung von Proteinen (auch nach Überexpression) wird häufig als Proteinreinigung bezeichnet. Zur Proteinreinigung steht eine Vielzahl an etablierten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

Die Fest-Flüssig-Trennung ist eine Grundoperation bei Proteinisolierungen. Sowohl bei der Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium als auch bei der Klärung des Rohextraktes nach Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, bei der Abtrennung von Niederschlägen nach Fällungen usw. ist der Verfahrensschritt erforderlich. Er erfolgt durch Zentrifugation und Filtration.

Durch Gewinnung intrazellulärer Proteine muss die Zellwand zerstört bzw. durchlässig gemacht werden. Je nach Maßstab und Organismus werden dazu Hochdruckhomogenisatoren oder Rührwerkskugel- bzw. Glasperlenmühlen eingesetzt. Im Labormaßstab kommen u.a. mechanische Zellintegrationen und Ultraschallbehandlung zum Einsatz.

Sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine (nach Zellaufschluss) sind verschiedene Fällungsverfahren mit Salzen (insbesondere Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln (Alkohole, Aceton) eine schnelle und effiziente Methode zur Konzentration von Proteinen. Bei der Reinigung intrazellulärer Proteine ist die Entfernung der löslichen Nukleinsäuren erstrebenswert (Fällung z.B. mit Streptomycin- oder Protaminsulfat). Bei der Gewinnung extrazellulärer Proteine werden häufig Träger (z.B. Stärke, Kieselgur) vor Zugabe der Fällungsmittel zugesetzt, um besser handhabbare Niederschläge zu erhalten.

5 Für die Feinreinigung stehen zahlreiche chromatographische und Verteilungsverfahren zur Verfügung (Absorptions- und Ionenaustauschchromatographie, Gel-filtration, Affinitätschromatographie, Elektrophoresen). Eine Säulenchromatographie wird auch im technischen Maßstab angewandt. Für den Labormaßstab ist vor allem die Affinitätschromatographie von Bedeutung, die Reinigungsfaktoren bis zu mehreren 100 pro Schritt ermöglicht.

10 Extrazelluläre Proteine fallen in relativ verdünnten Lösungen an. Sie müssen ebenso wie extrazelluläre Proteine vor ihrer weiteren Verwendung konzentriert werden. Neben den schon erwähnten Verfahren hat sich – auch im industriellen Maßstab – die Ultrafiltration bewährt.

15 Anorganische Salze als Begleitstoffe von Proteinen sind für spezifische Anwendungen häufig unerwünscht. Sie können u.a. durch Gelfiltration, Dialyse und Diafiltration entfernt werden.

20 Zahlreiche Proteine kommen als Trockenpräparate zum Einsatz. Als Trocknungsverfahren sind die Vakuum-, Gefrier- und Sprühtrocknung von Bedeutung.

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Das Photoprotein Bolinopsin wird durch die folgende Nukleotidsequenz kodiert (SEQ ID NO: 1):

5'-

ATGCCTCTAGACGAGACCAACAACGAAAGCTATAGATGGCTGAGAAGTGTGGGTAAC
GATTGGCAGTTTGTGATGTCGAGGACGTTTCATCCTAAACAGCTTAGTCGGCTCTACAAG
AGATTGACACCTTCGATCTAGACAGTGACGGTCGTATGGACATGGACGAGATCCTG
5 TACTGGCCCGACAGAATGAGGCAGCTGGTGAACGCTTCTGACGAACAGGTCGAGAAG
ATGAGGGCTGCTTGCTACACCTTCTTCCACAACAAAGGAGTGGATCCAGAAAAGGGA
CTCCTCAGAGACGACTGGGTTGAGGCTAACAGAGTATTTGCTGAGGCTGAAAGAGAG
AGGGAACGACGTGGCATGCCCTCCTTGATTGGTCTTTTGTGACGCTTACTACGAT
GTCCTGGATGATGACGGTGATGGTACTGTTGATGTTGATGAACTCAAACCATGATG
10 AAGGCTTTTGTATGTGCCCCAGGAGGCTGCCTACACCTTCTTTAAGAAAGCTGACACG
GATAATAGTGGAAGAACTGGAGAGAAGCGAACTGGTCCATCTCTTCAGAAAGTTCTGG
ATGGAATCCTACGATCCTCAGTGGGACGGTGTCTACGCTTACAAATATTAA-3'.

Daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 2):

15 MPLDETNNESYRWLRSVGNDWQFDVEDVHPKQLSRLYKRFDTFDLSDGRMDMDEIL
YWPDRMRQLVNASDEQVEKMRAACYTFFHNKGVDPEKGLLRDDWVEANRVFAEAERE
RERRGMPSLIGLLSDAYYDVLDDGDGTVDVDELKTMMKAFDVPQEAAYTFFKKADT
DNSGKLERSELVHLFRKFWMESYDPQWDGVYAYKY

20 Diese Sequenzen finden sich im Sequenzlisting wieder.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-Bolinopsin.

25 Fig. 2: Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-Bolinopsin

Fig. 3: Die Fig. 3 zeigt die Excitation von Bolinopsin. Y : Intensität; X : Wellenlänge [nm].

Fig. 4: Die Fig. 4 zeigt die Fluoreszenz von Bolinopsin. Y : Intensität; X : Wellenlänge [nm].

30 Fig. 5: Die Fig. 5 zeigt die Biolumineszenz von Bolinopsin. Y : Intensität; X : Wellenlänge [nm].

Fig. 6: Die Fig. 6 zeigt das Alignment von Bolinopsin und Aequorin (aequoria victoria) auf Nukleinsäureebene.

Fig. 7: Die Fig. 7 zeigt das Alignment von Bolinopsin und Aequorin (aequoria victoria) auf Aminosäureebene.

5 Fig. 8: Die Fig. 8 zeigt das Ergebnis der Biolumineszenzmessung von Bolinopsin nach bakterieller Expression. Y : Lumineszenz in RLU [relative light units]; X : μ l Lysat : 0 = uninduziertes Kontrolllysate.

Fig. 9: Die Fig. 9 zeigt das Ergebnis der Biolumineszenzmessung von Bolinopsin nach bakterieller Expression in Abhängigkeit vom eingesetzten Coelenterazinderivat. Y : Lumineszenz in RLU [relative light units]; X : Coelenterazinderivat : 1 = nativ, 2 = cp, 3 = f, 4 = fcp, 5 = hcp, 6 = h, 7 = i, 8 = ip, 9 = n; Balken : schwarz : uninduziertes Kontrolllysate; hell-grau : 10 μ l Lysate; weiss : 20 μ l Lysate; dunkel-grau : 40 μ l Lysate.

10

Beispiele

Beispiel 1

5 Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pTriplEx2 der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pTriplEx2-Bolinopsin bezeichnet. Der Vektor pTriplEx2-Bolinopsin wurde zur Expression von Bolinopsin in bakteriellen Systemen verwendet.

10 Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-Bolinopsin .

Beispiel 2

15 Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3.1(+) der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pcDNA3-Bolinopsin bezeichnet. Der Vektor pcDNA3-Bolinopsin wurde zur Expression von Bolinopsin in eukaryotischen Systemen verwendet.

20 Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-Bolinopsin .

Beispiel 3

Bakterielle Expression

25 Die bakterielle Expression erfolgte im E. coli Stamm BL21(DE3) durch Transformation der Bakterien mit den Expressionsplasmiden pTriplEX2-Bolinopsin und pTriplEX2. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und die Expression für 4 Stunden durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch
30 Zentrifugation geerntet, in PBS + 5 mM EDTA resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde 3 Stunden mit Coelenterazin im dunkeln inkubiert.

Direkt nach der Zugabe von 5 mM Calciumchlorid wurde die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Integrationszeit der Messung betrug 40 Sekunden.

Die Fig. 8 zeigt die Ergebnisse der Biolumineszenzmessung von Bolinopsin.

Beispiel 4

Eukaryotische Expression

Die konstitutive eukaryotische Expression erfolgte in CHO-Zellen durch Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-Bolinopsin und pcDNA3.1(+) in transienten Experimenten. Hierzu wurden 10000 Zellen pro Loch in DMEM-F12 Medium auf 96 Loch Mikrotiterplatten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Kits (Roche) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in DMEM-F12 Medium inkubiert.

Beispiel 5

BLAST

Ergebnis einer BLAST-Analyse von Bolinopsin auf der Aminosäureebene.

>pdb|1JF2|A Chain A, Crystal Structure Of W92f Obelin Mutant From Obelia Longissima At 1.72 Angstrom Resolution, Length = 195, Score = 85.1 bits (209), Expect = 8e-16, Identities = 52/177 (29%), Positives = 90/177 (50%), Gaps = 4/177 (2%)

>emb|CAD87698.1| unnamed protein product [synthetic construct], Length = 195, Score = 81.6 bits (200), Expect = 8e-15, Identities = 51/177 (28%), Positives = 89/177 (49%), Gaps = 4/177 (2%)

>pdb|1JF0|A Chain A, The Crystal Structure Of Obelin From Obelia Geniculata At 1.82 A Resolution, gb|AAL86372.1|AF394688_1 apoobelin

[Obelia geniculata], Length = 195, Score = 80.1 bits (196), Expect = 2e-14, Identities = 51/177 (28%), Positives = 89/177 (49%), Gaps = 4/177 (2%)

5 >sp|P39047|MYTR_MITCE Mitrocomin precursor, pir||S39022 mitrocomin precursor - Mitrocoma cellullaria, gb|AAA29298.1| apomitrocomin, Length = 198, Score = 78.6 bits (192), Expect = 7e-14, Identities = 47/177 (26%), Positives = 91/177 (50%), Gaps = 4/177 (2%)

10 >sp|Q08121|CLYT_CLYGR Clytin precursor (Phialidin), pir||S28860 clytin - hydromedusa (Clytia gregarium), emb|CAA49754.1| clytin [Clytia gregaria], gb|AAA28293.1| apoclytin, Length = 198, Score = 77.4 bits (189), Expect = 2e-13, Identities = 53/177 (29%), Positives = 89/177 (49%), Gaps = 4/177 (2%)

Beispiel 6

BLAST

20 Ergebnis einer BLAST-Analyse von Bolinopsin auf Nukleinsäureebene.

>gb|AC073341.10| Homo sapiens BAC clone RP11-549I23 from 7, complete sequence, Length = 185574, Score = 52.6 bits (27), Expect = 4e-04, Identities = 33/36 (91%)

25 >gb|AC092850.13| Homo sapiens 12 BAC RP11-346B9 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence, Length = 176733, Score = 46.8 bits (24), Expect = 0.023, Identities = 32/36 (88%)

>gb|AC126564.7| Homo sapiens 12 BAC RP11-638F5 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence, Length = 121242, Score = 46.8 bits (24), Expect = 0.023, Identities = 32/36 (88%)

30 >gb|AC093924.3| Genomic sequence for Mus musculus, clone RP23-239M9, from chromosome 17, complete sequence, Length = 166277, Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.086, Identities = 31/35 (88%)

35 >gb|AC060234.11| Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-523O18, complete sequence, Length = 170073, Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.086, Identities = 31/35 (88%)

>gb|AC084727.14| Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-507P23, complete sequence, Length = 188652, Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.086, Identities = 31/35 (88%)

5 **Beispiel 7**

Die Fig. 6 zeigt das Alignment von Bolinopsin mit Aequorin (*Aequoria victoria*) auf Nukleinsäureebene.

10 **Beispiel 8**

Die Fig. 7 zeigt das Alignment von Bolinopsin mit Aequorin (*Aequoria victoria*) auf Aminosäureebene.

15 **Beispiel 9**

Spektrum des Photoproteins Bolinopsin

20 Zur Messung der spektralen Eigenschaften von Bolinopsin wurden *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pTriplEX2-CGFP und pTriplEX2 transformiert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und einer Inkubation von 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Bakterien geerntet und in PBS resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Ultraschall. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz bzw. Biolumineszenz. Das Maximum der Exitation lag bei 25 352 nm, der Fluoreszenz bei 452 nm und das der Biolumineszenz bei 468 nm.

Die Fig. 3 zeigt die Exitation von Bolinopsin

Die Fig. 4 zeigt die Fluoreszenz von Bolinopsin

Die Fig. 5 zeigt die Biolumineszenz von Bolinopsin

Beispiel 10

Zur Identifizierung von Substraten für Bolinopsin wurden 5 µl Lösungen verschiedener Coelenterazinderivate (10^{-4} M) in Methanol mit jeweils 0, 10, 20 und 40 µl Lysat in einem Gesamtvolumen von 75 µl für 3 Stunden bei 4°C inkubiert und die Lumineszenz nach der Zugabe von 25 µl Calciumchlorid (Endkonzentration 5 mM) gemessen. Die Coelenterazine wurden von Sigma (Deutschland) bezogen. Bolinopsin zeigte mit allen eingesetzten Coelenterazinderivaten Biolumineszenzaktivität. Die höchste Aktivität könnte mit dem nativen Coelenterazin gemessen werden.

Die Fig. 9 zeigt die Coelenterazin-Derivate als potentielle Substrate für Bolinopsin und eine grafische Darstellung der Lumineszenzmessung für 30 Sekunden bei 8,7 kV im Luminometer (RLU, relative light units).

Literatur / Patente

US 6,495,355

US 5,541,309

US 5,093,240

US-0908909

US 6,152,358

JP-0176125

GB-0024357

WO03006497

WO200168824

5 Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54

10 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402

Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

15 Fagan TF, Ohmiya Y, Blinks JR, Inouye S, Tsuji FI. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS Lett.* 1993 Nov 1;333(3):301-5

20 Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.

25 Haddock SH, Rivers TJ, Robison BH. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Sep 25;98(20):11148-51

30 Inouye S, Tsuji FI. (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar 21;341(2-3):277-80

Inouye S, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett.* 1993 Jan 11;315(3):343-6.

5 Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. *Gene.* 1995 Feb 14;153(2):273-4.

Jones K, Hibbert F, Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends Biotechnol* 1999 Dec;17(12):477-81

10 Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.

15 Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.

Phillips GN. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7

20 Shimomura O, Johnson FH. Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry.* 1969 Oct;8(10):3991-7

25 Shimomura O., Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72

Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem J.* 1986 Mar 1;234(2):271-7.

30 Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.

Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R., Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology*. 1997 23(6) 1110ff

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 umfasst;
 - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz umfassen;
 - c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen;
 - d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
 - e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen; und
 - f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, welche einen funktionalen Promotor 5' zur das Photoprotein kodierenden Sequenz enthält.
3. Rekombinante DNA oder RNA Vektoren, welche Nukleinsäuren nach Anspruch 2 enthalten.

4. Organismen, die einen Vektor gemäß Anspruch 3 enthalten.
5. Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu einer Teilsequenz eines Nukleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 1 sind.
6. Polypeptid, das durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 kodiert ist.
10. 7. Verfahren zur Expression der Photoprotein Polypeptide gemäß Anspruch 6 in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.
8. Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines Photoprotein Polypeptides gemäß Anspruch 6.
15. 9. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein Bolinopsin erkannt werden.
20. 10. Verwendung einer für ein Photoprotein kodierende Nukleinsäure gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 als Marker- oder Reportergen.
11. Verwendung eines Photoproteins gemäß Anspruch 6 als Marker oder Reporter.

Isoliertes Photoprotein Bolinopsin, sowie dessen Verwendung

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft das Photoprotein Bolinopsin, dessen Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des Photoproteins Bolinopsin.

Fig. 1

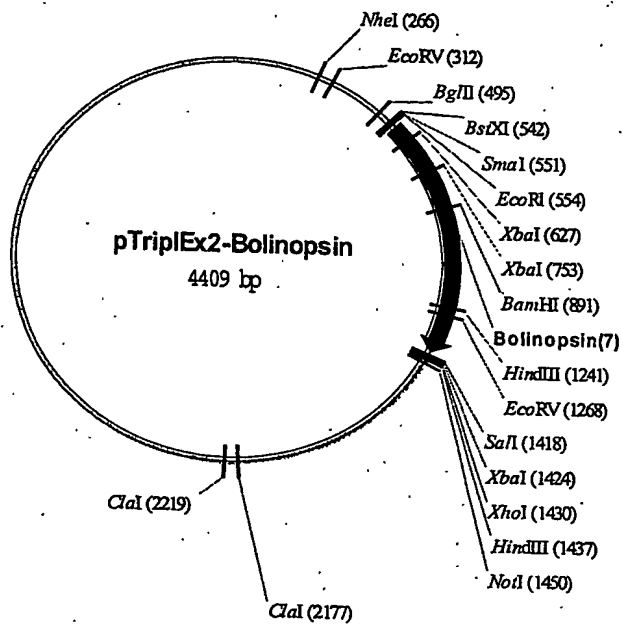


Fig. 2

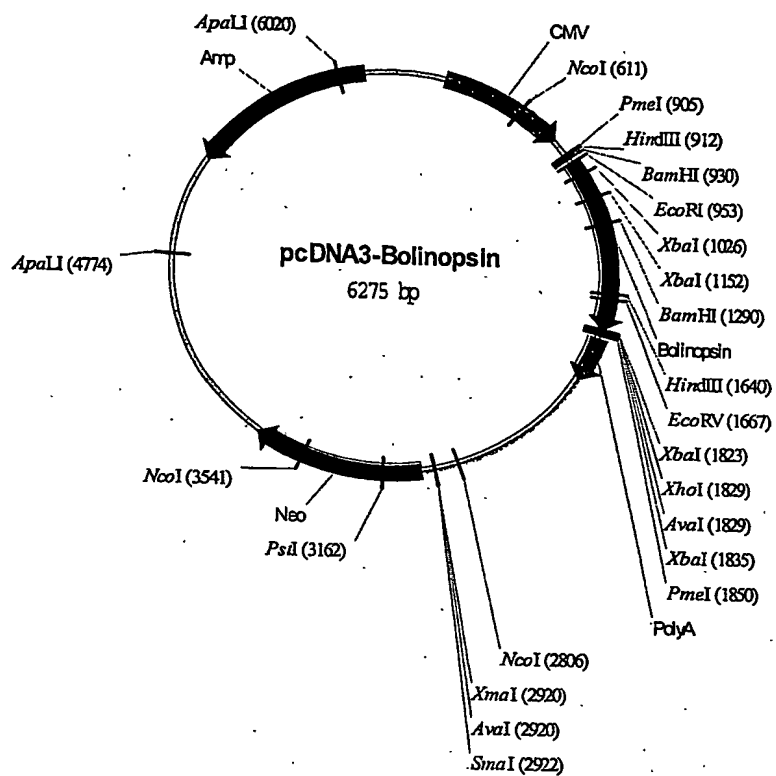


Fig. 3

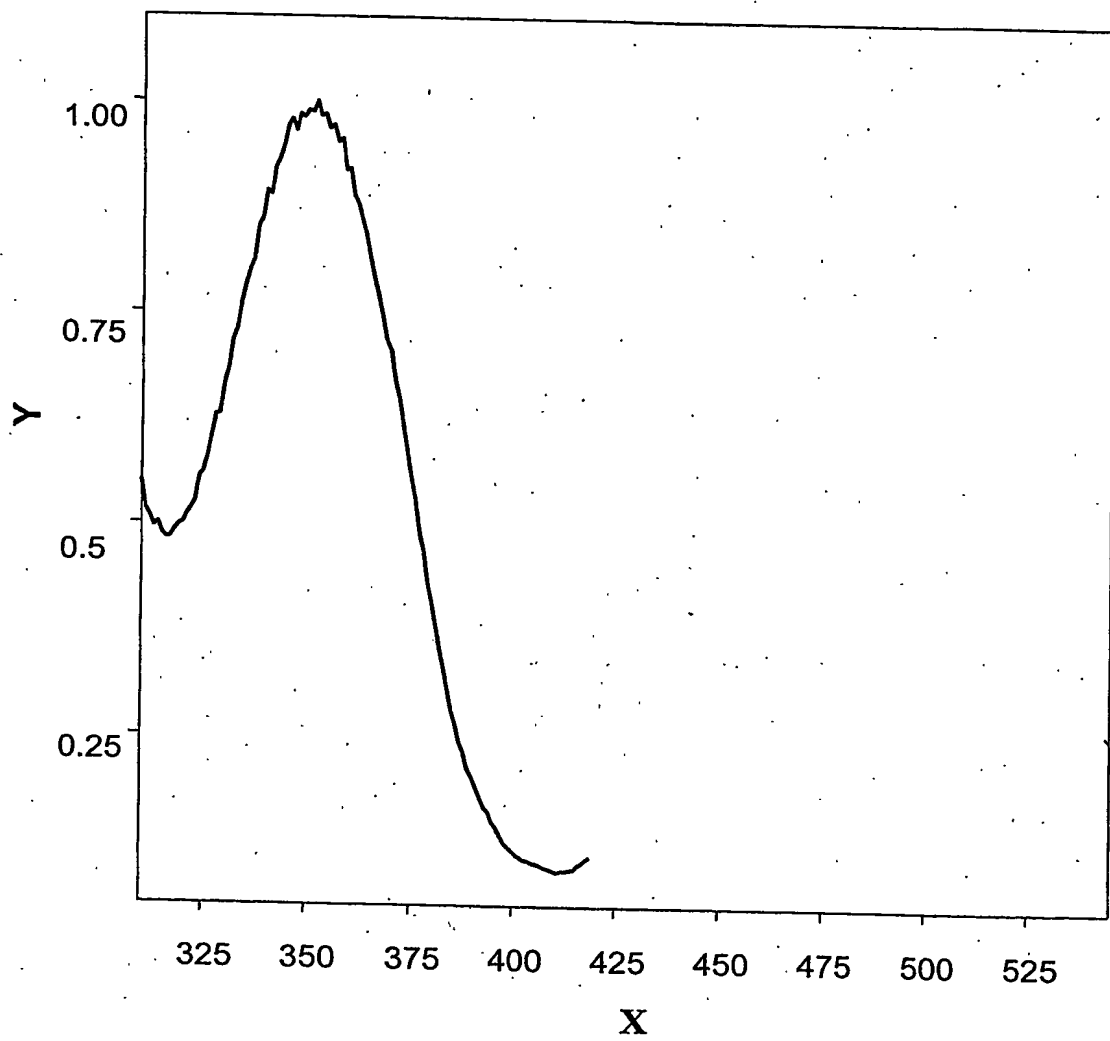


Fig. 4

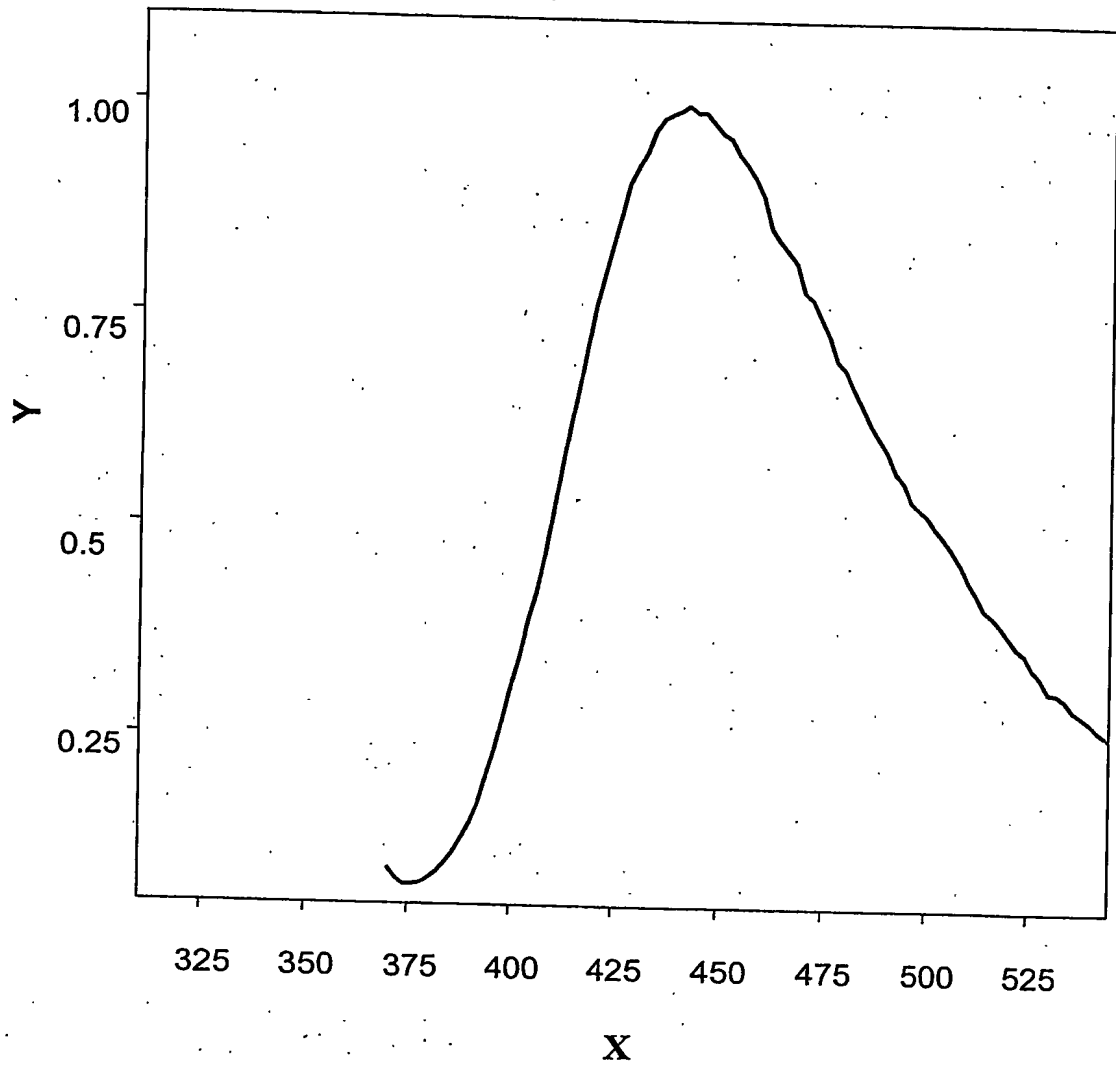


Fig. 5

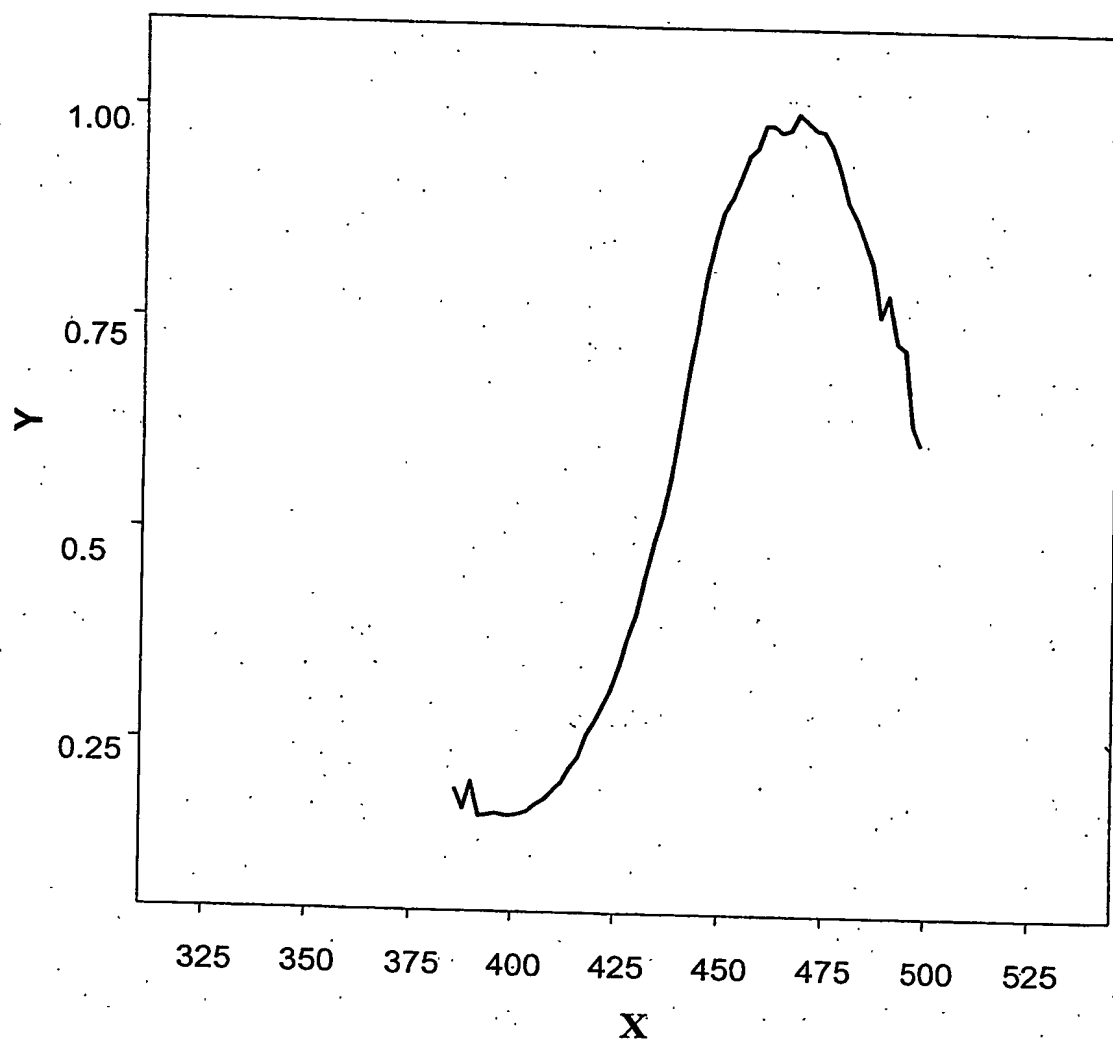


Fig. 6

aequorin _000: ATGACAAGCAAACTACTCAGTCAAGCTTACATCAGACTTCGACAACCAAG--ATGGA
 score _000: ATG C CTC TA A AGAC C ACAAC AAG AT GA
 bolinopsin_000: ATG-----C-----CTC-----TAGACGAGAC--CAACAACGAAAGCTATAGA

aequorin _060: TTGGACGACACAAGCATATGT-TCAATTTC-----TTGATGTCAACCAC---AAT-GGAAA
 score _060: TGG G A AAG T GT C ATT C TTGATGTC A AC AT AAA
 bolinopsin_060: -TGGCTG--AGAAGTGTGGTAAACGATTGGCAGTTTGGATGTCGAGGACGTTTCATCCTATAA

aequorin _120: AATCT-----CTCTTGACGAGATGGTCTACA-AGGC-ATCT-GATATTGTC-ATC-AA
 score _120: A CT CTCT A GAGAT TC ACA C ATCT GA A TG C TC A
 bolinopsin_120: CAGCTTAGTCGGCTCTACAAGAGAT--TCGACACCTTCGATCTAGACAGTGACGGTCGTA

Fig. 6 Fortsetzung

aequorin _180:TAACCTTGGAGCAACA-CCTGAGCAAGCCAAACGACACAAAGA---TGCTGTAGAAGCCT
 score _180:T C TGGA C A A CCTG C GCC CGACA AA GA GCTG GAA CT
 bolinopsin_180:TGGACATGGA-CGAGATCCTGTACTGGCC---CGACAGAATGAGGCAGCTGGTGAACGCT

aequorin _240:TCTTCGGAGGAGCTGGAATGAAATATGGTGTGGAACTGATTG----GCCTGCAT--ATA
 score _240:TCT GA AG T GA GAA G TG GG CTG TTG CCT C T A A
 bolinopsin_240:TCTGACGAACAGGTCGA--GAA----GATGAGG--GCTGCTTGCTACACCTTCTTCCACA

aequorin _300:TTGAAGGA-TGGA---A-AAAATTGGCTACT-----GATGAAT---TGGAG---AA-----
 score _300: AAGGA TGGA A AAAA G CT CT GA GA T T GAG AA
 bolinopsin_300:ACAAAGGAGTGGATCCAGAAAAGGGACTCCTCAGAGACGACTGGGTTGAGGCTAACAGAG

Fig. 6 Fortsetzung

```

aequorin_360:-AT-----ACGCCAAA-----ACGAACCAACG-----CTC-----ATCCGTATAT
score_360: AT A GC AAA A G A C ACG CTC AT GT T T
bolinopsin_360:TATTTGCTGAGGCTGAAAGAGAGAGAGGGAACGACGTGGCATGCCCTCCTTGATTGGTCTTT

aequorin_420:GGGGTGATGCTTTGTTTGATATCGTTGACAAAGATCAAAATGGAGCCATTACACTGGATG
score_420: G GA GCTT T GAT TC T GA A GA ATGG C TT T GATG
bolinopsin_420:TGTCAGACGCTTACTACGATGTCTCGGATGATGACGGTGATGGTACTGTGTGATGTTGATG

aequorin_480:AA-TGGAAGCATACACCAAGCTGCTGTATCATCCAATCATCAGAAGATTGGGAGGAA
score_480:AA T AAA CAT A AA GCT TG AT CC C CAG AG T G A
bolinopsin_480:AACTCAAACCAT-GATGAAGGCTTTTG--ATGTGCC---C--CAGGAGGCT--GCCTAC

```

Fig. 6 Fortsetzung

aequorin _540:ACATTC---AGAGTGTGC-GATATTGATGAAAGTGGACAACTCGATGTTGATGAGATGAC
score _540:AC TTC A AG GC GA A GAT A AGTGG AACT GA G GA G GA AC
bolinopsin_540:ACCTTCTTTA-AGAAAGCTGACACGGATAATAGTGGAAAACTGGA-G-AGAAGCGA--AC

aequorin _600:AAGACAACAT---TT-AGGA--TTTTGG-T--ACACCATGGATCCTGCTTGCGAAAAGCT
score _600: G C CAT TT AG A TT TGG T A CC GATCCT TG GA T
bolinopsin_600:TGGTC--CATCTCTCAGAAAGTTCTGGATGGAATCCTACGATCCTCAGTGGGACGGTGT

aequorin _660:CTACG-GTGGAGCTGTCCCCTAA
score _660:CTACG T A T T TAA
bolinopsin_660:CTACGCTTACAAATAT-----TAA

Fig. 7

```

AEQUORIN _000: VKLTP-DFDNPKW---IG-----RH-KHM-----FNFLDVNHNGRISLDEMZYKA
score _000: L | | | | W | G H K | | F | D | | GR | | DE | | Y |
BOLINOPSIN _000: MPLDETNNESYRWLSRGNDWQFDVEDVHPKQLSRLYKRFDTFDLSDGRMDMDEILYWP

AEQUORIN _060: SDIVINNIGATPEQAKRHKDAVEAFFGGAAMKYGVETEWPEYIEGW----KRLASEELKR
score _060: D | | A | EQ | | | | | A | FF | | GV | E | | | W | | A E | R |
BOLINOPSIN _060: -DRMRQLVNASDEQVEKMRACYTFF----HNKGVDPEKGLLRDDWVEANRVFAEAEERER

AEQUORIN _120: YSKNQITLIRLWGDALFDI IDKQNGAISLDEWKAYTKSAGIIQSSDCCEETFRVCDIDE
score _120: | LI L DA | | D | D D G | | DE K | K | | Q E | F | D | D |
BOLINOPSIN _120: ERRGMPSLIGLLSDAYYDVLDLDDGDGTVDVDELKTMKAFDVPQ--EAAATFFKKADTDN

```

Fig. 7 Fortsetzung

AEQUORIN _180:SGQLDVDEMTROHLG--FWY-TMDPACEKLYGGAV---P
score _180:SG|L| E| HL FW| |DP | G||
BOLINOPSIN_180:SGKLERSEL--VHLFRKFWMESYDP-----QWDGVYAYKY

Fig. 8

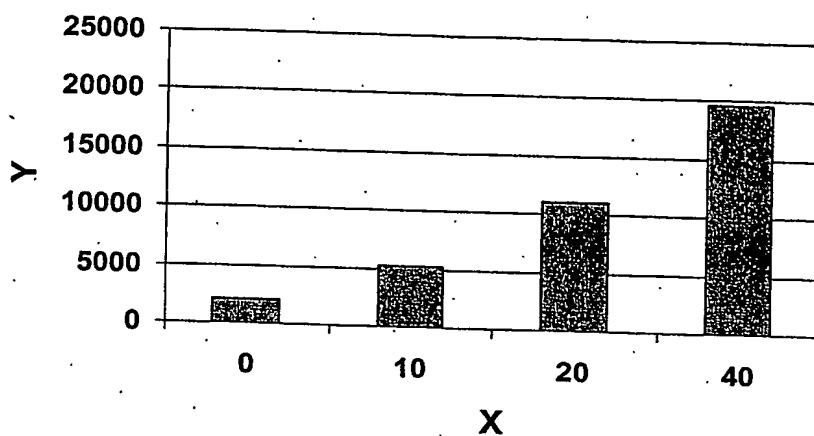
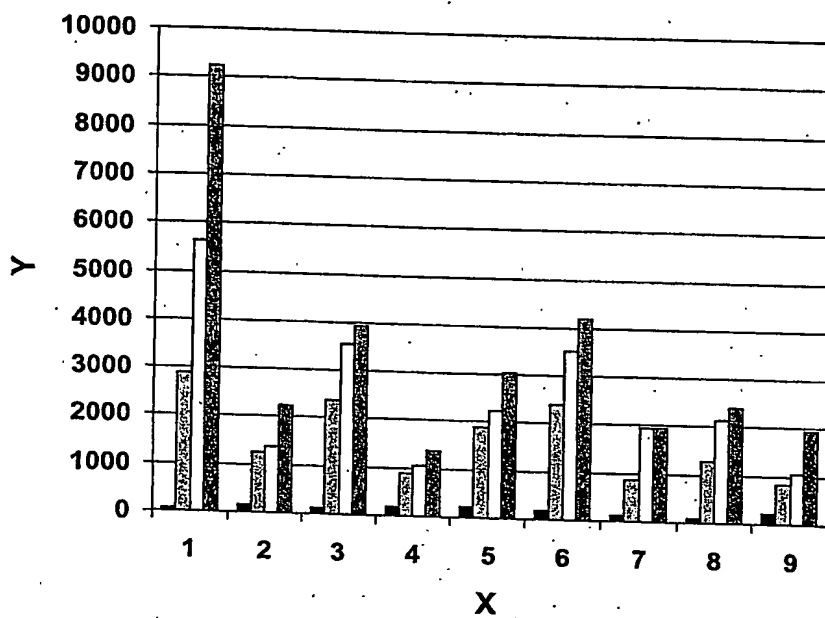


Fig. 9



SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG, BHC

<120> Isoliertes Photoprotein Bolinopsin, sowie dessen Verwendung

<130> Le A 36 792

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 621

<212> DNA

<213> Bolinopsis infundibulum

<400> 1

```

atgcctctag acgagaccaa caacgaaagc tatagatggc tgagaagtgt gggtaacgat      60
tggcagtttg atgtcgagga cgttcatcct aaacagctta gtcggctcta caagagattc      120
gacaccttcg atctagacag tgacgggtcgt atggacatgg acgagatcct gtactggccc      180
gacagaatga ggcagctggg gaacgcttct gacgaacagg tcgagaagat gagggctgct      240
tgctacacct tcttcacaaa caaaggagtg gatccagaaa agggactcct cagagacgac      300
tgggttgagg ctaacagagt atttgctgag gctgaaagag agaggggaacg acgtggcatg      360
ccctccttga ttggtctttt gtcagacgct tactacgatg tcctggatga tgacgggtgat      420
ggtagctgtg atgttgatga actcaaaacc atgatgaagg cttttgatgt gccccaggag      480
gctgcctaca ccttctttaa gaaagctgac acggataata gtggaaaact ggagagaagc      540
gaactggtcc atctcttcag aaagttctgg atggaatcct acgatcctca gtgggacggt      600
gtctacgctt acaaatatta a

```

<210> 2

<211> 206

<212> PRT

<213> Bolinopsis infundibulum

<400> 2

```

Met Pro Leu Asp Glu Thr Asn Asn Glu Ser Tyr Arg Trp Leu Arg Ser
1      5      10      15
Val Gly Asn Asp Trp Gln Phe Asp Val Glu Asp Val His Pro Lys Gln
20     25     30
Leu Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Phe Asp Thr Phe Asp Leu Asp Ser Asp
35     40     45
Gly Arg Met Asp Met Asp Glu Ile Leu Tyr Trp Pro Asp Arg Met Arg
50     55     60
Gln Leu Val Asn Ala Ser Asp Glu Gln Val Glu Lys Met Arg Ala Ala
65     70     75     80
Cys Tyr Thr Phe Phe His Asn Lys Gly Val Asp Pro Glu Lys Gly Leu
85     90     95
Leu Arg Asp Asp Trp Val Glu Ala Asn Arg Val Phe Ala Glu Ala Glu
100    105    110
Arg Glu Arg Glu Arg Arg Gly Met Pro Ser Leu Ile Gly Leu Leu Ser
115    120    125
Asp Ala Tyr Tyr Asp Val Leu Asp Asp Asp Gly Asp Gly Thr Val Asp
130    135    140
Val Asp Glu Leu Lys Thr Met Met Lys Ala Phe Asp Val Pro Gln Glu
145    150    155    160
Ala Ala Tyr Thr Phe Phe Lys Lys Ala Asp Thr Asp Asn Ser Gly Lys
165    170    175
Leu Glu Arg Ser Glu Leu Val His Leu Phe Arg Lys Phe Trp Met Glu
180    185    190
Ser Tyr Asp Pro Gln Trp Asp Gly Val Tyr Ala Tyr Lys Tyr
195    200    205

```

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.